

イスラエル国産株を用いた tomato brown rugose fruit virus の宿主範囲や 伝染方法等の調査

大矢 仁志¹⁾・榊原 友香・松浦 貴之

横浜植物防疫所調査研究部

Research on the Host Range and Transmission Method of Tomato Brown Rugose Fruit Virus Using Israeli Isolate. Hitoshi Oya¹⁾, Yuka Sakakibara and Takayuki Matsuura (Research Division, Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10 Shin-yamashita, Naka-Ku, Yokohama 231-0801 Japan. ¹⁾Haneda Airport Sub-station, Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan.* 59: 13-18 (2023)

Abstract: The tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV genus *Tobamovirus*) is a relatively new virus that was first observed in 2014 and 2015 affecting tomatoes in Israel and Jordan. It is known to infect tomatoes and peppers. We investigated the host range and physical properties of the virus as part of efforts to support effective ToBRFV control strategies in readiness for the entry of the virus in Japan. When plants of 18 species in the following 14 families were mechanically inoculated with sap from an infected tomato plants, *Lamium amplexicaule* and *Tetragonia tetragonioides* might be susceptible to the virus. The virus was easily transmitted mechanically by contaminated gardening shears and other equipment between infected and healthy tomato plants. No horizontal and vertical transmission by pollen from tomato plants was observed. In the in-vitro longevity test of the virus, the virus remained infectious in crude sap at room temperature, even after 18 months of incubation. The virus in tomato leaves dried for two months also remained infectious. This suggested a high viral concentration in tomato roots relative to other parts.

Key Words: tomato brown rugose fruit virus, Host range, *Lamium amplexicaule*

緒言

tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) は、*Tobamovirus* 属に分類される新種のウイルスで、トマト (*Solanum lycopersicum*) やトウガラシ (*Capsicum annuum*) に生育衰退や、葉、花序、果実等の奇形を誘発するなどの被害をもたらしている (EPPO, 2021)。本ウイルスは、2014年のイスラエル及び2015年のヨルダンでの発見報告に始まり (Luria *et al.*, 2017, Salem *et al.*, 2016)、その後、メキシコ、米国、ドイツ、イタリア、パレスチナ、トルコ及び中国で発生が確認されている (Oladokun *et al.*, 2019)。宿主植物に関しては、トマトやトウガラシに加え、2種の雑草 (*Chenopodium murale* 及び *Solanum nigrum*) で報告があるが、その情報は限られている (EPPO, 2021)。また、ToBRFV は、トマトにおいて TM-2² 抵抗性遺伝子を持つトバモウイルス抵抗性品種を打破するため、世界的に拡大することが懸念されている (Luria *et al.*, 2017)。

本ウイルスに対しては、トルコが2019年2月にトマト及びトウガラシ属種子の輸入に対し、本ウイルスへの緊急措置を通

報した (WTO/SPS, 2019a) 他、同年2月に豪州 (WTO/SPS, 2019b)、3月にニュージーランド (WTO/SPS, 2019c)、10月にEU (WTO/SPS, 2019d) が同様に措置を通報するなど、世界各国が検疫措置を講じている。我が国においてもその侵入が危惧され、輸入検疫の対象となる病害虫及び輸入植物検疫措置の見直しの第6次改正において植物防疫法施行規則別表1及び別表2-2に追加された (令和2年11月11日施行)。本調査では、ToBRFV が万が一、国内に発生した際の防除に資するため、基礎的知見を得ることを目的とし、各種接種試験や物理的性質の調査を行った。ここでは、これらの試験の結果について取りまとめる。

材料及び方法

1. 宿主範囲調査

(1) 供試試料

農林水産大臣の許可を得てイスラエルから導入した ToBRFV (農林水産省指令元横植第503号) に感染したトマト (品種：

¹⁾ 横浜植物防疫所羽田空港支所

ラトガス) 苗及びその凍結乾燥葉を供試した。感染苗は25℃に設定した温室内で管理した。

(2) 各種草本植物への汁液接種試験

調査植物として14科、18種の草本植物 (Table 2) を使用し、汁液接種は、ToBRFV 感染トマト葉に0.1M リン酸緩衝液を加えて磨砕し、本葉1~4葉期の葉にカーボランダムを用いた常法により調査植物1株あたり2枚の葉に綿棒で接種した。各調査植物は3~5株を使用した。接種株及び健全株は温室内で管理した。

(3) 各種草本植物における感染確認

接種1週間後の接種葉と2~3週間後の上位葉の病徴の有無を観察した。さらに、病徴の有無に関係なくこれらの葉から1枚を採取し、*Nicotiana glutinosa* 苗の葉2枚に汁液接種した。接種3~5日後に病斑の有無により感染を確認した。

2. 伝染方法の調査

(1) 人工授粉による花粉伝染試験

ToBRFV 感染トマトの花粉を健全トマト3株(1株につき2花)に受粉し、2か月後に受粉株を *N. glutinosa* 苗に汁液接種して3~5日後に病斑の有無により感染を確認した。また、受粉株の果実から採種した種子を播種し、約45日後に感染の有無を *N. glutinosa* 苗に汁液接種して確認した。

(2) 接触伝染試験

1) 手指を介した接触伝染試験

最初に、ToBRFV 感染トマト苗の葉及び茎を、ラテックス手袋を着用した手指で軽く擦り、健全トマト苗3株の葉及び頂芽を強く圧迫する操作を1~5回行った。苗は温室内で管理し、24日後及び50日後に *N. glutinosa* 苗への汁液接種により、感染の有無を調査した。

2) 剪定鋏を介した接触伝染試験

最初に ToBRFV 感染トマト苗の葉及び茎等を剪定鋏で5回切り、次に汁液が付着した刃の部分で健全トマト苗3株の葉柄を切る操作を1,3及び5回行った。苗は温室内で管理し、28日後及び50日後に *N. glutinosa* 苗への汁液接種により、感染の有無を調査した。

3. 物理的性質の調査

(1) 耐保存性試験

1) トマト葉の磨砕粗汁液における耐保存性

ToBRFV 感染トマト葉1gに0.1M リン酸緩衝液20mlを加

えて磨砕し、3000rpm、2分で遠心し上澄みを50ml チューブに入れ、室温で保管した。2日~1年半保管後 (Table 5A 参照)、*N. glutinosa* 苗に汁液接種を実施した。

2) トマト苗汁液付着カミソリ刃上における耐保存性

12枚のカミソリを準備し ToBRFV 感染トマト苗の葉柄をカミソリで切り付ける操作を3回行った。汁液が付着したカミソリを自然乾燥し、室温で保管した。2日~1年半保管後 (Table 5B 参照)、カミソリを3分割し、3株の健全トマト苗の茎をそれぞれのカミソリで切り付ける操作を各株3回行い、さらに、葉柄の切断を1ヶ所行った。苗は温室内で管理し、*N. glutinosa* 苗への汁液接種により、感染の有無を調査した。

3) 枯死トマト葉における耐保存性

ToBRFV 感染トマト苗1株から葉2枚を採取し、同温室内で1~2ヵ月間乾燥後、乾燥トマト感染葉を *N. glutinosa* 苗に汁液接種を実施した。

(2) 耐熱性試験

ToBRFV 感染トマト葉1gに0.1M リン酸緩衝液20mlを加えて磨砕した。3000rpm、2分で遠心し、上清を回収した。回収した上清を分注し、サーマルサイクラーで10分間熱処理 (50℃~100℃) 後、*N. glutinosa* 苗に汁液接種を行い、感染の有無を調査した。

4. 感染トマト各器官におけるウイルス濃度調査

花序が形成された ToBRFV 感染トマト苗から、葉、茎、根、がく、花弁の各器官を同量採取し、根については流水洗浄を行った。各器官に10倍量の0.1M リン酸緩衝液を加えて磨砕し、核酸抽出に供試した。

核酸抽出には、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社) を用いた。磨砕液100µlにキット付属の抽出バッファーを500µl添加し、その後はプロトコルの記載に従って核酸抽出を実施し、最終的に60µlのRNase Free Waterに溶解した。

得られた核酸を鋳型とし、TaqMan RNA-to-Ct1-Step Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用い、F/R各プライマー0.3µM、プローブ0.2µMの濃度で反応液を調製した。リアルタイムPCR反応は、Quant Studio 5リアルタイムPCRシステム (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて、48℃15分、95℃10分、(95℃10秒、60℃1分)を40サイクルの条件で増幅を行った。ウイルス遺伝子量は、QuantStudio Design & Analysis ソフトウェアのComparative Ct法により相対定量として算出した。なお、

Table 1. Primers used for One-step real-time RT-PCR amplification in this study.

Primer/probe name	Sequence (5'-3')	Target	Source
18S-H-F	GGGATCGGAGTAATGATTAACAGG	Endogenous plant 18S ribosomal RNA gene	Tanizawa <i>et al.</i> (2018) Wakabayashi <i>et al.</i> (2018)
18S-H-R	CTTTCGCAGTTGTTCTGCTTTC		
18S-H-P	Cy5-TCACCTCTGACTATGAAATACGAATGCC-IBRQ		
CaTa28 Fw	GGTGGTGTCAGTGCTGTTT	ToBRFV movement protein (MP) gene	ISHI-Veg (2020)
CaTa28 Rv	GCGTCCTTGGTAGTGATGTT		
CaTa28 Pr	6FAM-AGAGAATGGAGAGAGCGGACGAGG-BHQ1		

比較対象にはサンプルとは別途抽出した ToBRFV 感染トマト葉の抽出核酸を用いた。また、ToBRFV の検出には、ISHI-Veg (2020) のプロトコルに記載されているプライマー・プローブを用いて、また、植物内在性遺伝子の増幅には、谷澤ら (2018) 及び若林ら (2018) が設計したプライマー・プローブを用いて行った (Table 1)。

結果及び考察

1. 宿主範囲調査

14 科 18 種の草本植物に汁液接種試験を実施した結果、ツル

ナ (*Tetragonia tetragonioides*) の接種葉並びにホトケノザ (*Lamium amplexicaule*) の接種葉及び上位葉で病徴が発現し、これら 2 種の接種葉及び上位葉を *N. glutinosa* 苗に接種したところ、ツルナの上位葉を除き接種葉に壞疽斑が形成された。また、病徴が確認されなかった植物の接種葉及び上位葉を試料として同様に *N. glutinosa* 苗に接種した結果、ツルナ及びホトケノザに加え 6 科 7 種の植物で *N. glutinosa* 葉に壞疽斑が形成され、ToBRFV の感染が確認された (Table 2)。以上の結果から、病徴が認められたツルナ及びホトケノザ並びに潜在感染が認められた 6 科 7 種の草本植物について、ToBRFV の宿主となる可能性が示された。ただし、ホトケノザ以外の植物では、上位葉

Table 2. Experimental host range of ToBRFV.

Plant species Family name Scientific name	Symptoms		Inoculation test of <i>N. glutinosa</i> plants	
	L	S	L	S
Chenopodiaceae				
<i>Chenopodium foetidum</i>	–	–	4/5 ^a	0/5
Amaranthaceae				
<i>Gomphrena globosa</i>	–	–	0/5	0/5
Cucurbitaceae				
<i>Citrullus lanatus</i>	–	–	0/5	0/5
Asteraceae, Compositae				
<i>Zinnia elegans</i>	–	–	3/5	0/5
<i>Eclipta alba (Eclipta prostrata)</i>	–	–	0/5	0/5
Aizoaceae				
<i>Tetragonia tetragonioides</i>	NR	–	5/5	0/5
Convolvulaceae				
<i>Ipomoea nil</i>	–	–	5/5	0/5
Brassicaceae, Cruciferae				
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	–	–	0/5	0/5
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	–	–	0/4	0/4
Lamiaceae, Labiatae				
<i>Perilla frutescens</i> var. <i>crispata</i>	–	–	5/5	0/5
<i>Lamium amplexicaule</i>	CS	CS, Y	5/5	5/5
<i>Mosla dianthera</i>	–	–	5/5	0/5
Fabaceae, Leguminosae				
<i>Vicia sativa</i> subsp. <i>nigra</i>	–	–	0/5	0/5
Caryophyllaceae				
<i>Stellaria media</i>	–	–	0/3	0/3
Polygonaceae				
<i>Rumex crispus</i>	–	–	5/5	0/5
Apiaceae, Umbelliferae				
<i>Torilis japonica</i>	–	–	0/5	0/5
Scrophulariaceae				
<i>Veronica persica</i>	–	–	5/5	0/5
Onagraceae				
<i>Oenothera parviflora (O. biennis)</i>	–	–	0/5	0/5

L: local infection, S: systemic infection, NR: necrotic ring, CS: chlorotic spots, Y: yellowing, -: no symptoms, a: Number of infected plants/total number of plants

において病徴及び *N. glutinosa* 葉への接種による壞疽斑形成が見られなかったことから、全身感染には至らない可能性が示された。これらのことから、本ウイルスは複数の雑草に感染する可能性が考えられ、園地等においては、特にホトケノザ等の全身感染が認められた雑草の適切な防除が必要であると考えられた。

2. 伝染方法の調査

(1) 人工授粉による花粉伝染試験

人工受粉 2 か月後のトマト苗において感染の有無を確認した結果、ToBRFV の感染は見られなかった。当該トマト苗 2 株から 3 個の果実が得られ、種子を 145 粒採種した。これらの種子を播種し、生育したトマト苗を約 1 か月半後に *N. glutinosa* 苗を用いて感染確認をした結果、いずれの株においても壞疽斑は見られず、感染は確認されなかった (Table 3)。このことから、ToBRFV は花粉による水平・垂直伝染は

Table 3. Horizontally transmitted by pollen.

Fruit no.	Infected plants ^a
1	0/35 ^b
2	0/53
3	0/57

a: Plants were grown from seeds obtained from the fruit formed after pollination with ToBRFV infected pollen.

b: Number of infected plants/total number of inoculated plants

Table 4. Mechanical transmission of ToBRFV.

A. Transmission via contaminated hands.

	Times of contact		
	1	3	5
24dpi	0/3 ^a	3/3	3/3
50dpi	1/3	3/3	3/3

The acronym dpi stands for days post inoculation.

a: Number of infected plants/total number of inoculated plants

Table 5. Infectivity of ToBRFV after incubation at room temperature.

A. Infectivity of crude sap.

Storage period	Infected plants
2 days	5/5 ^a
8 days	5/5
14 days	5/5
21 days	5/5
1 month	5/5
2 months	5/5
3 months	5/5
6 months	5/5
9 months	5/5
1 year	5/5
1 year 3 months	5/5
1 year 6 months	5/5

a: Number of infected plants/total number of inoculated plants

しない可能性が示された。

(2) 接触伝染試験

1) 手指を介した接触伝染試験

手指による接触伝染調査においては、その回数が、1 回では 3 株中 1 株で接触 50 日後に感染が確認され、3 回及び 5 回ではいずれも 3 株中 3 株すべてで接触 24 日後に感染が確認された (Table 4A)。

2) 剪定鋏を介した接触伝染試験

剪定鋏による接触伝染調査では、その接触回数が 1 回では 3 株中 2 株、3 回では 3 株中 1 株、5 回では 3 株中 2 株の感染が確認された (Table 4B)。

以上の結果から、ToBRFV は接触等で極めて伝染し易いことが示唆された。

3. 物理的性質の調査

(1) 耐保存性試験

1) トマト葉の磨砕粗汁液における耐保存性

耐保存性調査では、1 年 6 ヶ月後まで当該ウイルスの耐保存性を調査した。その結果、1 年 6 ヶ月間常温保管した粗汁液でも *N. glutinosa* 苗で壞疽斑が確認され、感染能を有することが確認された (Table 5A)。

2) トマト苗汁液付着カミソリ刃上における耐保存性

汁液が付着したカミソリを用いて 1 年 6 ヶ月後まで当該ウイルスの耐保存性を調査した。その結果、1 年 3 ヶ月間常温保管したカミソリで壞疽斑が確認された (Table 5B)。

B. Transmission via gardening shears.

	Times of clipping		
	1	3	5
28dpi	2/3 ^a	1/3	2/3
50dpi	2/3	1/3	2/3

B. Infectivity on blade.

Storage period	Infected plants
2 days	1/3 ^a
8 days	3/3
14 days	0/3
21 days	2/3
1 month	2/3
2 months	1/3
3 months	2/3
6 months	0/3
9 months	0/3
1 year	1/3
1 year 3 months	1/3
1 year 6 months	0/3

Table 6. Infectivity of ToBRFV after drying period.

Drying period	Leaf no.	Infected plants
1month	1	3/3 ^a
	2	3/3
2months	1	3/3
	2	3/3

a: Number of infected plants/total number of inoculated plants

Table 7. Infectivity of crude sap after heat treatment.

Treatments ^a (°C)	Infected plants
50	3/3 ^b
60	3/3
70	3/3
80	1/3
90	0/3
100	0/3

a: Sap samples were incubated for 10 minutes

b: Number of infected plants/total number of inoculated plants

3) 枯死トマト葉における耐保存性

トマト感染葉を1～2ヵ月間乾燥させ、その感染能を調査したところ、2ヵ月間乾燥させたトマト葉でも *N. glutinosa* 苗に壞疽斑が形成され、感染能を有すると考えられた (Table 6)。

以上の結果から、ToBRFV は磨碎汁液中でも分解されにくく、感染能を長期に渡り保持することが示唆され、栽培管理に使用する器具の消毒及び圃場における植物残渣の除去等の圃場管理が重要であると考えられた。

(2) 耐熱性試験

50℃、60℃、70℃で処理した粗汁液において、*N. glutinosa* 苗で壞疽斑が確認され、80℃処理した粗汁液では、1葉の1点のみではあったものの壞疽斑が確認された。一方で、90℃、100℃で処理した粗汁液では、壞疽斑は確認されなかった (Table 7)。よって、本ウイルスは熱に対する安定性が高く、80℃以下の温度で10分間の熱処理では感染能を失活させるには、不十分であることが判明した。

4. 感染トマト各器官におけるウイルス濃度調査

リアルタイム RT-PCR により濃度調査をした結果、他器官に比べ、根でウイルスの遺伝子量が高く、根においてウイルス濃度が高いことが示唆された。また、茎においては遺伝子量が低く、ウイルス濃度が他器官に比べ低い可能性が示された (Fig. 1)。一方で、供試した株が2株と少数であり、葉や根等試料ごとの遺伝子量に差が見られることから、より詳細な解析には個体数を増やす等が必要であることが考えられた。

トバモウイルスのウイルス粒子は感染植物体内に高濃度に蓄積し、感染植物残渣が土壌中に残ることにより、次作に苗を定植した際に根元の傷口から感染することが知られている (久保田, 2016)。これらのことから、地下部の根に含まれるウイル

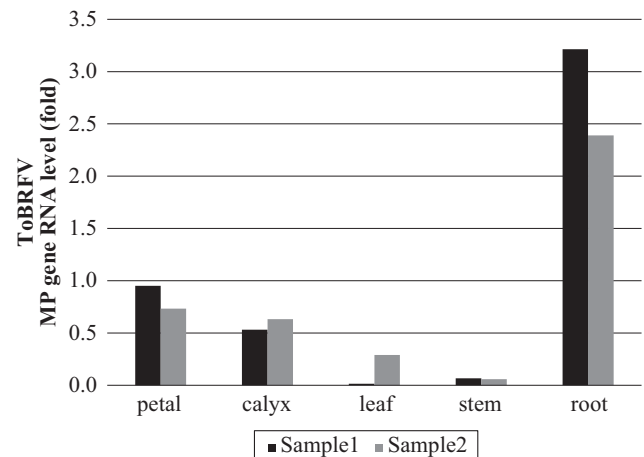


Fig. 1. ToBRFV in tomato plants was detected by determining the RT-qPCR relative amount of ToBRFV MP (Movement protein) gene to that of the tomato 18S rRNA gene.

ス粒子が感染源となる可能性も考えられ、植物残渣を除去する際には地下部を含めて取り除くことが重要であることが示唆された。

引用文献

- EPPO (2021) PM 7/146 (1) Tomato brown rugose fruit virus. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. **51**: 178–197.
- ISHI-Veg (2020) Detection of infectious *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in tomato and pepper seed.
- 久保田健嗣 (2016) 抵抗性打破能を有するトマトモザイクウイルスの近年の発生. 植物防疫 **70**: 17-20.
- Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., Elad, N., Tam, Y., Sela, N., Abu-Ras, A., Ezra, N., Haberman, A., Yitzhak, L., Lachman, O., Dombrovsky, A. (2017) A new Israeli *Tobamovirus* isolate infects tomato plants harboring *Tm-2²* resistance genes. *PLoS One*. **12**: e0170429.
- Oladokun, J.O., Halabi, M.H., Barua, P., Nath, P.D. (2019) Tomato brown rugose fruit disease: current distribution, knowledge and future prospects. *Plant Pathol.* **68**: 1579-1586.
- Salem, N., Mansour, A., Ciuffo, M., Falk, B.W., Turina, M. (2016) A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Arch. Virol.* **161**: 503-506.
- 谷澤颯太・若林伶奈・延原愛・平栗章弘・西尾健・鍵和田聡 (2018) リアルタイム RT-PCR によるウメ輪紋ウイルスの絶対定量および昆虫針を用いた定量的検出技術の開発. 日本植物病理学会報 **84**: 204-205. (講要)
- 若林伶奈・谷澤颯太・延原愛・平栗章弘・西尾健・鍵和田聡 (2018) 日本におけるウメ輪紋ウイルス M 系統 3 分離株のゲノム塩基配列およびリアルタイム RT-PCR 検出技術の開発. 日本植物病理学会報 **84**: 205. (講要)
- WTO/SPS (2019a) Notification of emergency measures (G/SPS/N/TUR/109) 26 February 2019.

WTO/SPS (2019b) Notification of emergency measures (G/SPS/N/AUS/469) 28 February 2019.

WTO/SPS (2019c) Notification of emergency measures (G/SPS/N/NZL/591) 28 March 2019.

WTO/SPS (2019d) Notification of emergency measures (G/SPS/N/EU/350) 2 October 2019.